

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

11011 U.S. PTO
09/963668
09/27/01

In re PATENT APPLICATION of
Inventor(s): RIEPING et al.

Appln. No.: 0
Series Code ↑ Serial No. ↑

Group Art Unit: to be assigned

Filed: September 25, 2001 (herewith)

Examiner: to be assigned

Title: Fermentation Process for the Preparation of L-Amino
Acids Using Strains of the Family Enterobacteriaceae

Atty. Dkt. P 283665 000425 BT
M# Client Ref

Date: September 27, 2001

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT IN ACCORDANCE WITH THE REQUIREMENTS OF RULE 55

Hon. Asst Commissioner of Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

Please accept the enclosed certified copy(ies) of the respective foreign application(s) listed below for which benefit under 35 U.S.C. 119/365 has been previously claimed in the subject application and if not is hereby claimed.

<u>Application No.</u>	<u>Country of Origin</u>	<u>Filed</u>
DE 100 48 605.3	GERMANY	September 30, 2000
DE 100 55 516.0	GERMANY	November 9, 2000
DE 101 30 192.8	GERMANY	June 22, 2001

Respectfully submitted,

Pillsbury Winthrop LLP
Intellectual Property Group

1600 Tysons Boulevard

McLean, VA 22102
Tel: (703) 905-2000
Atty/Sec: MAS/AMX

By Atty: Michael A. Sanzo Reg. No. 36912

Sig: Michael A. Sanzo Fax: (703) 905-2500
Tel: (703) 905-2173



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 55 516.0

Anmeldetag: 9. November 2000

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE

Erstanmelder: Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,
Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung: Verfahren zur fermentativen Herstellung von
L-Aminosäuren unter Verwendung von Stämmen
der Familie Enterobacteriaceae

Priorität: 30.09.2000 DE 100 48 605.3

IPC: C 12 N, C 12 P

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 6. August 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Dzierzon

**Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren
unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae**

Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin,
5 unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae, in denen das pckA-Gen abgeschwächt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren finden in der Tierernährung, in der
10 Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie Anwendung.

Es ist bekannt L-Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen der Enterobacteriaceae, insbesondere Escherichia coli und Serratia marcescens, herzustellen. Wegen der großen
15 Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z.B. die Zuckerkonzentration während der
20 Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform, durch z.B. Ionenaustauschchromatographie, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser
25 Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. das Threonin-Analogon α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure (AHV) oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und
30 L-Aminosäuren wie z.B. L-Threonin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung L-Aminosäuren produzierender Stämme der Familie Enterobacteriaceae eingesetzt, indem man einzelne

Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung
auf die Produktion untersucht.

Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich die Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, bereitzustellen.

5

Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung von Mikroorganismen der

- 10 Familie Enterobacteriaceae, die insbesondere bereits L-Threonin produzieren, und in denen die für das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEP-Carboxykinase) (EC 4.1.1.49) kodierende Nukleotidsequenz (pckA-Gen) abgeschwächt wird.

- 15 Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise
- 20 einen schwachen Promotor oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man folgende

25 Schritte durchführt:

- a) Fermentation von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen zumindest das pckA-Gen abgeschwächt wird,
- b) Anreicherung der entsprechenden L-Aminosäure im
- 30 Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, und
- c) Isolieren der gewünschten L-Aminosäure.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, gegebenenfalls Stärke, gegebenenfalls Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es handelt sich um Vertreter der Familie Enterobacteriaceae, ausgewählt aus den Gattungen Escherichia, Erwinia, Providencia und Serratia. Die Gattungen Escherichia und Serratia werden bevorzugt. Bei der Gattung Escherichia ist insbesondere die Art Escherichia coli und bei der Gattung Serratia insbesondere die Art Serratia marcescens zu nennen.

Geeignete, insbesondere L-Threonin produzierende Stämme der Gattung Escherichia, insbesondere der Art Escherichia coli sind beispielsweise

- 15 Escherichia coli TF427
- Escherichia coli H4578
- Escherichia coli KY10935
- Escherichia coli VNIIGenetika MG442
- Escherichia coli VNIIGenetika M1
- 20 Escherichia coli VNIIGenetika 472T23
- Escherichia coli BKIIM B-3996
- Escherichia coli kat 13
- Escherichia coli KCCM-10132

- Geeignete L-Threonin produzierende Stämme der Gattung Serratia, insbesondere der Art Serratia marcescens sind beispielsweise

- Serratia marcescens HNr21
 - Serratia marcescens TLr156
 - Serratia marcescens T2000
- 30 L-Threonin produzierende Stämme aus der Familie der Enterobacteriaceae besitzen bevorzugt unter anderen ein oder mehrere der genetischen bzw. phänotypischen Merkmale ausgewählt aus der Gruppe: Resistenz gegen α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure, Resistenz gegen Thialysin, Resistenz
- 35 gegen Ethionin, Resistenz gegen α -Methylserin, Resistenz

- gegen Diaminobernsteinsäure, Resistenz gegen α -Aminobuttersäure, Resistenz gegen Borrelidin, Resistenz gegen Rifampicin, Resistenz gegen Valin-Analoga wie beispielsweise Valinhydroxamat, Resistenz gegen
- 5 Purinanaloge wie beispielsweise 6-Dimethylaminopurin, Bedürftigkeit für L-Methionin, gegebenenfalls partielle und kompensierbare Bedürftigkeit für L-Isoleucin, Bedürftigkeit für meso-Diaminopimelinsäure, Auxotrophie bezüglich Threonin-haltiger Dipeptide, Resistenz gegen L-Threonin,
- 10 Resistenz gegen L-Homoserin, Resistenz gegen L-Lysin, Resistenz gegen L-Methionin, Resistenz gegen L-Glutaminsäure, Resistenz gegen L-Aspartat, Resistenz gegen L-Leucin, Resistenz gegen L-Phenylalanin, Resistenz gegen L-Serin, Resistenz gegen L-Cystein, Resistenz gegen L-
- 15 Valin, Empfindlichkeit gegenüber Fluoropyruvat, defekte Threonin-Dehydrogenase, gegebenenfalls Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung, Verstärkung des Threonin-Operons, Verstärkung der Homoserin-Dehydrogenase I-Aspartatkinase I bevorzugt der feed back resistenten Form, Verstärkung der
- 20 Homoserinkinase, Verstärkung der Threoninsynthase, Verstärkung der Aspartatkinase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form,
- 25 Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-Synthase, Verstärkung der Transhydrogenase, Verstärkung des RhtB-Genproduktes, Verstärkung des RhtC-Genproduktes, Verstärkung des YfiK-Genproduktes, Verstärkung der Malat:Chinon Oxidoreduktase und Verstärkung einer Pyruvat-Carboxylase und Abschwächung
- 30 der Essigsäurebildung.

Es wurde gefunden, daß Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae nach Abschwächung, insbesondere Ausschaltung des für die PEP-Carboxykinase (EC 4.1.1.49) kodierenden pckA-Gens in verbesserter Weise L-Aminosäuren,

35 insbesondere L-Threonin produzieren.

Die Nukleotidsequenz des pckA-Gens von Escherichia coli wurde von Medina et al. (Journal of Bacteriology 172, 7151-7156 (1990) publiziert und kann ebenfalls der von Blattner et al. (Science 277, 1453 - 1462 (1997) publizierten

- 5 Genomsequenz von Escherichia coli entnommen werden. Die Nukleotidsequenz des pckA-Gens von Escherichia coli ist in SEQ ID No. 1 und die Aminosäuresequenz des dazugehörigen Genproduktes in SEQ ID No. 2 dargestellt.

- Die in den angegebenen Textstellen beschriebenen pckA-Gene
10 können erfindungsgemäß verwendet werden. Weiterhin können Allele des pckA-Gens verwendet werden, die sich aus der Degeneriertheit des genetischen Codes oder durch funktionsneutrale Sinnmutationen (sense mutations) ergeben.

- Zur Erzielung einer Abschwächung können beispielsweise die
15 Expression des pckA-Gens oder die katalytischen Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt bzw. ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

- Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete
20 Kulturführung, durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression oder auch durch Antisense-RNA Technik erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren,
25 Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem beispielsweise bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195 (1998)), bei Carrier und Keasling (Biotechnology Progress 15, 58-64 (1999), Franch
30 und Gerdes (Current Opinion in Microbiology 3, 159-164 (2000)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie beispielsweise dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von
35 Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt. Als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Yano et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences-USA 95, 5511-5515 (1998)), Wente und Schachmann (Journal of Biological Chemistry 266, 20833-20839 (1991) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z. B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen (missense mutations) oder Nichtsinnmutationen (nonsense mutations) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen (frame shift mutations), die dazu führen, daß falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z. B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Ein Beispiel für ein Plasmid, mit Hilfe dessen das pckA-Gen von Escherichia coli durch ortsspezifische Mutagenese abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet werden kann, ist das Plasmid pMAK705ΔpckA (Figur 1). Es enthält lediglich einen Teil der 5'- und einen Teil der 3'-Region des pckA-

Gens. Ein 349 bp langer Abschnitt der Kodierregion fehlt (Deletion). Die Sequenz dieser für die Mutagenese des pckA-Gens einsetzbaren DNA ist in SEQ ID No. 3 dargestellt.

- Die Deletionsmutation des pckA-Gens kann durch Gen- bzw.
- 5 Allelaustausch in geeignete Stämme eingebaut werden.

Eine gebräuchliche Methode ist die von Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 174, 4617 - 4622 (1989)) beschriebene Methode des Genaustauschs mit Hilfe eines konditional replizierenden pSC101-Derivates pMAK705. Andere

10 im Stand der Technik beschriebene Methoden wie beispielsweise die von Martinez-Morales et al. (Journal of Bacteriology 1999, 7143-7148 (1999)) oder die von Boyd et al. (Journal of Bacteriology 182, 842-847 (2000)) können gleichfalls benutzt werden.

- 15 Nach erfolgtem Austausch liegt in dem betreffenden Stamm die in SEQ ID No. 4 dargestellte Form des Δ pckA-Allels vor, die ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist.

Es ist ebenfalls möglich, Mutationen im pckA-Gen oder Mutationen, die die Expression des pckA-Gens betreffen,

20 durch Konjugation oder Transduktion in verschiedene Stämme zu überführen.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin mit Stämmen der Familie Enterobacteriaceae vorteilhaft sein, zusätzlich zur

25 Abschwächung des pckA-Gens ein oder mehrere Enzyme des bekannten Threonin-Biosyntheseweges oder Enzyme des anaplerotischen Stoffwechsels oder Enzyme für die Produktion von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat zu verstärken.

- 30 Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene

erhöht, einen starken Promotor oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

5 So können beispielsweise gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon
10 (US-A-4,278,765),
- das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen (DE-A-19 831 609),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen (Molecular and General Genetics 231:332 (1992)),
- 15 • das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende ppc-Gen (Gene 31:279-283 (1984)),
- die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB (European Journal of Biochemistry 158:647-653 (1986)),
- 20 • das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB (EP-A-0994190),
- das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC (EP-A-1013765)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

25 Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des pckA-Gens eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen
30 (Ravnikar und Somerville, Journal of Bacteriology 169, 4716-4721 (1987)),

- das für die Malat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.37) kodierende mdh-Gen (Vogel et al., Archives in Microbiology 149, 36-42 (1987)),
- 5 • das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfa (Accession Number AAC77180 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) und SEQ ID No. 5)
- 10 • das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfP (Accession Number AAC77179 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) und SEQ ID No. 5)

abzuschwächen, insbesondere auszuschalten oder die Expression zu verringern.

15 Die Abschwächung des offenen Leserahmens yjfa und/oder des offenen Leserahmens ytfP wird bevorzugt.

Ein Beispiel für ein Plasmid, mit Hilfe dessen die offenen Leserahmen yjfa und ytfP von Escherichia coli durch ortsspezifische Mutagenese abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet werden können, ist das Plasmid pMAK705 Δ yjfa 20 (Figur 2). Es enthält lediglich die 5'- und die 3'-Flanke der ytfP-yjfa Region einschließlich sehr kurzer Reste der offenen Leserahmen yjfa und ytfP. Ein 337 bp langer Teil der ytfP-yjfa Region fehlt (Deletion). Die Sequenz dieser für die Mutagenese der ytfP-yjfa Region einsetzbaren DNA 25 ist in SEQ ID No. 6 dargestellt.

Diese Deletionsmutation kann durch Gen- bzw. Allelaustausch in geeignete Stämme eingebaut werden.

Nach erfolgreichem Austausch liegt in dem betreffenden Stamm die in SEQ ID No. 6 dargestellte Form des Δ ytfP- und des 30 Δ yjfa- Allels vor, die ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur

Abschwächung des pckA-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, 5 UK, 1982).

- Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von 10 Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.
- 15 Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 20 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und gegebenenfalls Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, 25 Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, 30 Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung 35 verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden.

Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine

5 zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert

10 werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur

15 Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen

20 aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 25°C bis 45°C und vorzugsweise bei 30°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-

25 Aminosäuren bzw. L-Threonin gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse von L-Aminosäuren kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender

30 Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

35 Eine Reinkultur des Escherichia coli K-12 Stammes DH5 α /pMAK705 wurde am 12. September 2000 bei der Deutschen

Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag als DSM 13720 hinterlegt.

Eine Reinkultur des Escherichia coli K-12 Stammes
5 MG442 Δ pckA wurde am 02. Oktober 2000 bei der Deutschen
Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag als DSM 13761 hinterlegt.

Es ist erfindungsgemäß ebenfalls möglich, die Abschwächung
10 der offenen Leserahmen ytfP und yjfA einzeln vorzunehmen, um zu einer verbesserten Herstellung von L-Aminosäuren zu gelangen.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, wie z. B. L-Threonin, L-
15 Isoleucin, L-Methionin, L-Homoserin und L-Lysin, insbesondere L-Threonin.

Beispiele

Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* sowie
5 alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische
Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al.
(Molecular cloning - A laboratory manual (1989) Cold Spring
Harbour Laboratory Press) durchgeführt. Die Transformation
von *Escherichia coli* wurde, wenn nicht anders beschrieben,
10 nach Chung et al. (Proceedings of the National Academy of
Sciences of the United States of America USA (1989) 86:
2172-2175) durchgeführt.

Die Bebrütungstemperatur bei der Herstellung von Stämmen
und Transformanten war 37°C. Bei dem
15 Genaustauschverfahren nach Hamilton et.al. wurden
Temperaturen von 30°C und 44°C verwendet.

Beispiel 1

Konstruktion der Deletionsmutation des pckA-Gens

20 Teile der 5'- und 3'-Region des pckA-Gens wurden aus
Escherichia coli K12 unter Anwendung der Polymerase-
Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischen Oligonukleotiden
amplifiziert. Ausgehend von der Nukletidsequenz des pckA-
Gens in *E. coli* K12 MG1655 (SEQ ID No. 1) wurden folgende
25 PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg,
Deutschland):

pckA'5'-1: 5' - GATCCGAGCCTGACAGGTTA - 3'

pckA'5'-2: 5' - GCATGCGCTCGGTCAGGTTA - 3'

pckA'3'-1: 5' - AGGCCTGAAGATGGCACTATCG - 3'

30 pckA'3'-2: 5' - CCGGAGAAGCGTAGGTGTTA - 3'

Die für die PCR eingesetzte chromosomale E. coli K12 MG1655 DNA wurde nach Herstellerangaben mit „Qiagen Genomic-tips 100/G“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Ein ca. 500 bp grosses DNA-Fragment aus der 5'-Region des pckA-Gens (mit pck1 bezeichnet) und ein ca. 600 bp grosses DNA-Fragment aus der 3'-Region des pckA-Gens (mit pck2 bezeichnet) konnte mit den spezifischen Primern unter Standard-PCR-Bedingungen (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A guide to methods and applications, Academic Press) mit der Taq-DNA-Polymerase (Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland) amplifiziert werden. Die PCR-Produkte wurden den Herstellerangaben entsprechend jeweils mit dem Vektor pCR2.1TOPO (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Groningen, Niederlande) ligiert und in den E. coli Stamm TOP10F' transformiert. Die Selektion Plasmid tragender Zellen erfolgte auf LB Agar, der mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt war. Nach der Plasmid DNA Isolierung wurde der Vektor pCR2.1TOPOpck2 mit den Restriktionsenzymen StuI und XbaI gespalten und das pck2-Fragment nach der Auftrennung im 0,8%igen Agarosegel mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Der Vektor pCR2.1TOPOpck1 wurde nach der Plasmid DNA Isolierung mit den Enzymen EcoRV und XbaI gespalten und mit dem isolierten pck2-Fragment ligiert. Der E. coli Stamm DH5α wurde mit dem Ligationsansatz transformiert und Plasmid tragende Zellen auf LB Agar, der mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt war, selektioniert. Nach der Plasmid DNA Isolierung wurden durch die Kontrollspaltung mit den Enzymen SpeI und XbaI solche Plasmide nachgewiesen, in denen die in SEQ ID No. 3 dargestellte mutagene DNA Sequenz kloniert vorliegt. Eines der Plasmide wurde als pCR2.1TOPOΔpckA bezeichnet.

Beispiel 2

Konstruktion des Austauschvektors pMAK705ΔpckA

Das in Beispiel 1 beschriebene pckA-Allel wurde aus dem Vektor pCR2.1TOPOΔpckA nach der Restriktion mit den Enzymen

SpeI und XbaI und Auftrennung im 0,8%igen Agarosegel isoliert und mit dem Plasmid pMAK705 (Hamilton et al. (1989) Journal of Bacteriology 174, 4617 - 4622), das mit dem Enzym XbaI verdaut worden war, ligiert. Der

5 Ligationsansatz wurde in DH5 α transformiert und Plasmid tragende Zellen auf LB Agar, der mit 20 μ g/ml Chloramphenicol versetzt war, selektioniert. Die erfolgreiche Klonierung wurde nach Plasmid DNA Isolierung und Spaltung mit den Enzymen HpaI, KpnI, HindIII, SalI und

10 PstI nachgewiesen. Der entstandene Austauschvektor pMAK705 Δ pckA (= pMAK705deltapckA) ist in Figur 1 dargestellt.

Beispiel 3

15 Ortsspezifische Mutagenese des pckA-Gens in dem E. coli Stamm MG442

Der L-Threonin produzierende E. coli Stamm MG442 ist in der Patentschrift US-A- 4,278,765 beschrieben und bei der Russischen Nationalsammlung für industrielle

20 Mikroorganismen (VKPM, Moskau, Russland) als CMIM B-1628 hinterlegt.

Für den Austausch des chromosomalen pckA-Gens gegen das Plasmid-kodierte Deletionskonstrukt wurde MG442 mit dem Plasmid pMAK705 Δ pckA transformiert. Der Genaustausch

25 erfolgte mit dem von Hamilton et al. (1989) Journal of Bacteriology 174, 4617 - 4622) beschriebenen Selektionsverfahren und wurde durch Standard-PCR-Methoden (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A guide to methods and applications, Academic Press) mit folgenden Oligonukleotid

30 Primern verifiziert:

pckA'5'-1: 5' - GATCCGAGCCTGACAGGTTA - 3'

pckA'3'-2: 5' - CCGGAGAAGCGTAGGTGTTA - 3'

Der erhaltene Stamm wurde als MG442 Δ pckA bezeichnet.

Beispiel 4

Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm MG442 Δ pckA

MG442 Δ pckA wurde auf Minimalmedium mit der folgenden

- 5 Zusammensetzung vermehrt: 3,5 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l NH_4Cl , 0,1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/l Glucose, 20 g/l Agar. Die Bildung von L-Threonin wurde in batch Kulturen von 10 ml, die in 100 ml Erlenmeierkolben enthalten waren, überprüft. Dazu wurde 10 ml
- 10 Vorkulturmedium der folgenden Zusammensetzung: 2 g/l Hefeextrakt, 10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l KH_2PO_4 , 0,5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g/l CaCO_3 , 20 g/l Glucose beimpft und für 16 Stunden bei 37°C und 180 rpm auf einem ESR Inkubator der Firma Kühner AG (Birsfelden, Schweiz) inkubiert. 250 μ l
- 15 dieser Vorkultur wurden in 10 ml Produktionsmedium (25 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,018 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 30 g/l CaCO_3 , 20 g/l Glucose) überimpft und für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die optische Dichte (OD) der
- 20 Kultursuspension mit einem LP2W-Photometer der Firma Dr. Lange (Berlin, Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 660 nm bestimmt.

Anschließend wurde die Konzentration an gebildetem L-Threonin im steril filtrierte Kulturüberstand mit einem

- 25 Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenreaktion mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD	L-Threonin g/l
MG442	6,0	1,5
MG442 Δ pckA	5,4	3,7

Folgende Figuren sind beigelegt:

- Figur 1: pMAK705 Δ pckA (= pMAK705 Δ pckA)
- Figur 2: pMAK705 Δ yjfa (= pMAK705 Δ yjfa)

Längenangaben sind als ca.-Angaben aufzufassen. Die
5 verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende
Bedeutung:

- cat: Chloramphenicolresistenzgen
- rep-ts: temperatursensitive Replikationsregion des
Plasmides pSC101
- 10 • pck1: Teil der 5'-Region des pckA-Gens
- pck2: Teil der 3'-Region des pckA-Gens
- ytfP'-yjfa': trunkeerte Kodierregionen von ytfP und yjfa

Die Abkürzungen für die Restriktionsenzyme haben folgende
15 Bedeutung

- BamHI: Restriktionsendonuklease aus *Bacillus*
amyloliquefaciens
- BglII: Restriktionsendonuklease aus *Bacillus globigii*
- ClaI: Restriktionsendonuklease aus *Caryophanon latum*
- 20 • EcoRI: Restriktionsendonuklease aus *Escherichia coli*
- EcoRV: Restriktionsendonuklease aus *Escherichia coli*
- HindIII: Restriktionsendonuklease aus *Haemophilus*
influenzae
- KpnI: Restriktionsendonuklease aus *Klebsiella*
25 pneumoniae

- PstI: Restriktionsendonuklease aus *Providencia stuartii*
- PvuI: Restriktionsendonuklease aus *Proteus vulgaris*
- SacI: Restriktionsendonuklease aus *Streptomyces achromogenes*
- SalI: Restriktionsendonuklease aus *Streptomyces albus*
- SmaI: Restriktionsendonuklease aus *Serratia marcescens*
- XbaI: Restriktionsendonuklease aus *Xanthomonas badrii*
- 10 • XhoI: Restriktionsendonuklease aus *Xanthomonas holcicola*

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG

5 <120> Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren
unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae.

<130> 000425 BT

10 <140>

<141>

<160> 6

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1622

<212> DNA

20 <213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1620)

25 <223> pckA

<400> 1

30 atg cgc gtt aac aat ggt ttg acc ccg caa gaa ctc gag gct tat ggt 48
Met Arg Val Asn Asn Gly Leu Thr Pro Gln Glu Leu Glu Ala Tyr Gly
1 5 10 15

atc agt gac gta cat gat atc gtt tac aac cca agc tac gac ctg ctg 96
Ile Ser Asp Val His Asp Ile Val Tyr Asn Pro Ser Tyr Asp Leu Leu
20 25 30

35 tat cag gaa gag ctc gat ccg agc ctg aca ggt tat gag cgc ggg gtg 144
Tyr Gln Glu Glu Leu Asp Pro Ser Leu Thr Gly Tyr Glu Arg Gly Val
35 40 45

40 tta act aat ctg ggt gcc gtt gcc gtc gat acc ggg atc ttc acc ggt 192
Leu Thr Asn Leu Gly Ala Val Ala Val Asp Thr Gly Ile Phe Thr Gly
50 55 60

45 cgt tca cca aaa gat aag tat atc gtc cgt gac gat acc act cgc gat 240
Arg Ser Pro Lys Asp Lys Tyr Ile Val Arg Asp Asp Thr Thr Arg Asp
65 70 75 80

50 act ttc tgg tgg gca gac aaa ggc aaa ggt aag aac gac aac aaa cct 288
Thr Phe Trp Trp Ala Asp Lys Gly Lys Gly Lys Asn Asp Asn Lys Pro
85 90 95

ctc tct ccg gaa acc tgg cag cat ctg aaa ggc ctg gtg acc agg cag 336
Leu Ser Pro Glu Thr Trp Gln His Leu Lys Gly Leu Val Thr Arg Gln
100 105 110

55 ctt tcc ggc aaa cgt ctg ttc gtt gtc gac gct ttc tgt ggt gcg aac 384
Leu Ser Gly Lys Arg Leu Phe Val Val Asp Ala Phe Cys Gly Ala Asn
115 120 125

60 ccg gat act cgt ctt tcc gtc cgt ttc atc acc gaa gtg gcc tgg cag 432
Pro Asp Thr Arg Leu Ser Val Arg Phe Ile Thr Glu Val Ala Trp Gln
130 135 140

65 gcg cat ttt gtc aaa aac atg ttt att cgc ccg agc gat gaa gaa ctg 480
Ala His Phe Val Lys Asn Met Phe Ile Arg Pro Ser Asp Glu Glu Leu
145 150 155 160

	gca ggt ttc aaa cca gac ttt atc gtt atg aac ggc gcg aag tgc act	528
	Ala Gly Phe Lys Pro Asp Phe Ile Val Met Asn Gly Ala Lys Cys Thr	
5	165 170 175	
	aac ccg cag tgg aaa gaa cag ggt ctc aac tcc gaa aac ttc gtg gcg	576
	Asn Pro Gln Trp Lys Glu Gln Gly Leu Asn Ser Glu Asn Phe Val Ala	
	180 185 190	
10	ttt aac ctg acc gag cgc atg cag ctg att ggc ggc acc tgg tac ggc	624
	Phe Asn Leu Thr Glu Arg Met Gln Leu Ile Gly Gly Thr Trp Tyr Gly	
	195 200 205	
15	ggc gaa atg aag aaa ggg atg ttc tcg atg atg aac tac ctg ctg ccg	672
	Gly Glu Met Lys Lys Gly Met Phe Ser Met Met Asn Tyr Leu Leu Pro	
	210 215 220	
20	ctg aaa ggt atc gct tct atg cac tgc tcc gcc aac gtt ggt gag aaa	720
	Leu Lys Gly Ile Ala Ser Met His Cys Ser Ala Asn Val Gly Glu Lys	
	225 230 235 240	
25	ggc gat gtt gcg gtg ttc ttc ggc ctt tcc ggc acc ggt aaa acc acc	768
	Gly Asp Val Ala Val Phe Phe Gly Leu Ser Gly Thr Gly Lys Thr Thr	
	245 250 255	
	ctt tcc acc gac ccg aaa cgt cgc ctg att ggc gat gac gaa cac ggc	816
	Leu Ser Thr Asp Pro Lys Arg Arg Leu Ile Gly Asp Asp Glu His Gly	
	260 265 270	
30	tgg gac gat gac ggc gtg ttt aac ttc gaa ggc ggc tgc tac gca aaa	864
	Trp Asp Asp Asp Gly Val Phe Asn Phe Glu Gly Gly Cys Tyr Ala Lys	
	275 280 285	
35	act atc aag ctg tcg aaa gaa gcg gaa cct gaa atc tac aac gct atc	912
	Thr Ile Lys Leu Ser Lys Glu Ala Glu Pro Glu Ile Tyr Asn Ala Ile	
	290 295 300	
40	cgt cgt gat gcg ttg ctg gaa aac gtc acc gtg cgt gaa gat ggc act	960
	Arg Arg Asp Ala Leu Leu Glu Asn Val Thr Val Arg Glu Asp Gly Thr	
	305 310 315 320	
45	atc gac ttt gat gat ggt tca aaa acc gag aac acc cgc gtt tct tat	1008
	Ile Asp Phe Asp Asp Gly Ser Lys Thr Glu Asn Thr Arg Val Ser Tyr	
	325 330 335	
	ccg atc tat cac atc gat aac att gtt aag ccg gtt tcc aaa gcg ggc	1056
	Pro Ile Tyr His Ile Asp Asn Ile Val Lys Pro Val Ser Lys Ala Gly	
	340 345 350	
50	cac gcg act aag gtt atc ttc ctg act gct gat gct ttc ggc gtg ttg	1104
	His Ala Thr Lys Val Ile Phe Leu Thr Ala Asp Ala Phe Gly Val Leu	
	355 360 365	
55	ccg ccg gtt tct cgc ctg act gcc gat caa acc cag tat cac ttc ctc	1152
	Pro Pro Val Ser Arg Leu Thr Ala Asp Gln Thr Gln Tyr His Phe Leu	
	370 375 380	
60	tct ggc ttc acc gcc aaa ctg gcc ggt act gag cgt ggc atc acc gaa	1200
	Ser Gly Phe Thr Ala Lys Leu Ala Gly Thr Glu Arg Gly Ile Thr Glu	
	385 390 395 400	
65	ccg acg cca acc ttc tcc gct tgc ttc ggc gcg gca ttc ctg tcg ctg	1248
	Pro Thr Pro Thr 405 Phe Ser Ala Cys Phe Gly Ala Ala Phe Leu Ser Leu	
	410 415	

cac ccg act cag tac gca gaa gtg ctg gtg aaa cgt atg cag gcg gcg 1296
 His Pro Thr Gln Tyr Ala Glu Val Leu Val Lys Arg Met Gln Ala Ala
 420 425 430

5 ggc gcg cag gct tat ctg gtt aac act ggc tgg aac ggc act ggc aaa 1344
 Gly Ala Gln Ala Tyr Leu Val Asn Thr Gly Trp Asn Gly Thr Gly Lys
 435 440 445

10 cgt atc tcg att aaa gat acc cgc gcc att atc gac gcc atc ctc aac 1392
 Arg Ile Ser Ile Lys Asp Thr Arg Ala Ile Ile Asp Ala Ile Leu Asn
 450 455 460

15 ggt tcg ctg gat aat gca gaa acc ttc act ctg ccg atg ttt aac ctg 1440
 Gly Ser Leu Asp Asn Ala Glu Thr Phe Thr Leu Pro Met Phe Asn Leu
 465 470 475 480

20 gcg atc cca acc gaa ctg ccg ggc gta gac acg aag att ctc gat ccg 1488
 Ala Ile Pro Thr Glu Leu Pro Gly Val Asp Thr Lys Ile Leu Asp Pro
 485 490 495

cgt aac acc tac gct tct ccg gaa cag tgg cag gaa aaa gcc gaa acc 1536
 Arg Asn Thr Tyr Ala Ser Pro Glu Gln Trp Gln Glu Lys Ala Glu Thr
 500 505 510

25 ctg gcg aaa ctg ttt atc gac aac ttc gat aaa tac acc gac acc cct 1584
 Leu Ala Lys Leu Phe Ile Asp Asn Phe Asp Lys Tyr Thr Asp Thr Pro
 515 520 525

30 gcg ggt gcc gcg ctg gta gcg gct ggt ccg aaa ctg taa 1623
 Ala Gly Ala Ala Leu Val Ala Ala Gly Pro Lys Leu
 530 535 540

<210> 2
 35 <211> 540
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 2
 40 Met Arg Val Asn Asn Gly Leu Thr Pro Gln Glu Leu Glu Ala Tyr Gly
 1 5 10 15

Ile Ser Asp Val His Asp Ile Val Tyr Asn Pro Ser Tyr Asp Leu Leu
 20 25 30

45 Tyr Gln Glu Glu Leu Asp Pro Ser Leu Thr Gly Tyr Glu Arg Gly Val
 35 40 45

50 Leu Thr Asn Leu Gly Ala Val Ala Val Asp Thr Gly Ile Phe Thr Gly
 50 55 60

Arg Ser Pro Lys Asp Lys Tyr Ile Val Arg Asp Asp Thr Thr Arg Asp
 65 70 75 80

55 Thr Phe Trp Trp Ala Asp Lys Gly Lys Gly Lys Asn Asp Asn Lys Pro
 85 90 95

60 Leu Ser Pro Glu Thr Trp Gln His Leu Lys Gly Leu Val Thr Arg Gln
 100 105 110

Leu Ser Gly Lys Arg Leu Phe Val Val Asp Ala Phe Cys Gly Ala Asn
 115 120 125

65 Pro Asp Thr Arg Leu Ser Val Arg Phe Ile Thr Glu Val Ala Trp Gln
 130 135 140

Ala His Phe Val Lys Asn Met Phe Ile Arg Pro Ser Asp Glu Glu Leu
 145 150 155 160
 5 Ala Gly Phe Lys Pro Asp Phe Ile Val Met Asn Gly Ala Lys Cys Thr
 165 170 175
 Asn Pro Gln Trp Lys Glu Gln Gly Leu Asn Ser Glu Asn Phe Val Ala
 180 185 190
 10 Phe Asn Leu Thr Glu Arg Met Gln Leu Ile Gly Gly Thr Trp Tyr Gly
 195 200 205
 Gly Glu Met Lys Lys Gly Met Phe Ser Met Met Asn Tyr Leu Leu Pro
 210 215 220
 15 Leu Lys Gly Ile Ala Ser Met His Cys Ser Ala Asn Val Gly Glu Lys
 225 230 235 240
 Gly Asp Val Ala Val Phe Phe Gly Leu Ser Gly Thr Gly Lys Thr Thr
 245 250 255
 Leu Ser Thr Asp Pro Lys Arg Arg Leu Ile Gly Asp Asp Glu His Gly
 260 265 270
 25 Trp Asp Asp Asp Gly Val Phe Asn Phe Glu Gly Gly Cys Tyr Ala Lys
 275 280 285
 Thr Ile Lys Leu Ser Lys Glu Ala Glu Pro Glu Ile Tyr Asn Ala Ile
 290 295 300
 30 Arg Arg Asp Ala Leu Leu Glu Asn Val Thr Val Arg Glu Asp Gly Thr
 305 310 315 320
 Ile Asp Phe Asp Asp Gly Ser Lys Thr Glu Asn Thr Arg Val Ser Tyr
 325 330 335
 Pro Ile Tyr His Ile Asp Asn Ile Val Lys Pro Val Ser Lys Ala Gly
 340 345 350
 40 His Ala Thr Lys Val Ile Phe Leu Thr Ala Asp Ala Phe Gly Val Leu
 355 360 365
 Pro Pro Val Ser Arg Leu Thr Ala Asp Gln Thr Gln Tyr His Phe Leu
 370 375 380
 45 Ser Gly Phe Thr Ala Lys Leu Ala Gly Thr Glu Arg Gly Ile Thr Glu
 385 390 395 400
 Pro Thr Pro Thr Phe Ser Ala Cys Phe Gly Ala Ala Phe Leu Ser Leu
 405 410 415
 His Pro Thr Gln Tyr Ala Glu Val Leu Val Lys Arg Met Gln Ala Ala
 420 425 430
 55 Gly Ala Gln Ala Tyr Leu Val Asn Thr Gly Trp Asn Gly Thr Gly Lys
 435 440 445
 Arg Ile Ser Ile Lys Asp Thr Arg Ala Ile Ile Asp Ala Ile Leu Asn
 450 455 460
 60 Gly Ser Leu Asp Asn Ala Glu Thr Phe Thr Leu Pro Met Phe Asn Leu
 465 470 475 480
 Ala Ile Pro Thr Glu Leu Pro Gly Val Asp Thr Lys Ile Leu Asp Pro
 485 490 495

Arg Asn Thr Tyr Ala Ser Pro Glu Gln Trp Gln Glu Lys Ala Glu Thr
 500 505 510

5 Leu Ala Lys Leu Phe Ile Asp Asn Phe Asp Lys Tyr Thr Asp Thr Pro
 515 520 525

Ala Gly Ala Ala Leu Val Ala Ala Gly Pro Lys Leu
 530 535 540

10

<210> 3

<211> 1156

<212> DNA

15 <213> Escherichia coli

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1156)

20 <223> Mutagene DNA

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(522)

25 <223> Teil der 5'-Region (pck1) des pckA-Gens

<220>

<221> misc_feature

<222> (523)..(542)

30 <223> Technische DNA/Reste Polylinker-Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> (543)..(1156)

35 <223> Teil der 3'-Region (pck2) des pckA-Gens

<400> 3

ctagtaacgg cgcgcagtg gctggaattc ggcttgatcc gagcctgaca ggttatgagc 60
 40 gcgggggtgtt aactaatctg ggtgccgttg ccgtcgatcac cgggatcttc accgggtcggt 120
 caccaaaaga taagtatatc gtccgtgacg ataccactcg cgatactttc tgggtgggcag 180
 acaaaggcaa aggtaagaac gacaacaaac ctctctctcc ggaaacctgg cagcatctga 240
 aaggcctggt gaccaggcag ctttccggca aacgtctgtt cgttgctgac gctttctgtg 300
 gtgcgaaccc ggatactcgt ctttccgtcc gtttcatcac cgaagtggcc tggcaggcgc 360
 45 attttgtcaa aaacatgttt attcgcccga gcgatgaaga actggcaggt ttcaaaccag 420
 actttatcgt tatgaacggc gcgaagtgc ctaacccgca gtggaaagaa cagggtctca 480
 actccgaaaa ctctgtggcg tttaacctga ccgagcgcac gcaagccgaa ttctgcagat 540
 cctgaagatg gcactatcga ctttgatgat gggtcaaaaa ccgagaacac ccgcgtttct 600
 tatccgatct atcacatcga taacattggt aagccgggtt ccaaagcggg ccacgcgact 660
 aaggttatct tcctgactgc tgatgctttc ggcggtgttc cgccgggttc tcgcctgact 720
 50 gccgatcaaa ccagtatca cttcctctct ggcttcaccg ccaaactggc cgggtactgag 780
 cgtggcatca ccgaaccgac gccaaccttc tccgcttgct tcggcgcggc attcctgtcg 840
 ctgcaccgca ctcagtacgc agaagtgtg gtgaaacgta tgcaggcggc gggcgcgagc 900
 gcttatctgg ttaacactgg ctggaacggc actggcaaac gtatctcgat taaagatacc 960
 cgcgccatta tcgacgccat cctcaacggt tcgctggata atgcagaaac cttcactctg 1020
 55 ccgatgttta acctggcgat cccaaccgaa ctgccgggag tagacacgaa gattctcgat 1080
 ccgcgtaaca cctacgcttc tccggaagcc gaattctgca gatatccatc aactggcgag 1140
 ccgctcgagc atgcat 1156

60 <210> 4

<211> 1294

<212> DNA

<213> Escherichia coli

65 <220>

<221> misc_feature

```

<222> (1)..(3)
<223> Startkodon des delta pckA-Allels

<220>
5 <221> misc_feature
  <222> (1)..(598)
  <223> 5'-Region des delta pckA-Allels

<220>
10 <221> misc_feature
   <222> (599)..(618)
   <223> Technische DNA/Reste Polylinker-Sequenz

<220>
15 <221> misc_feature
   <222> (619)..(1291)
   <223> 3'-Region des delta pckA-Allels

<220>
20 <221> misc_feature
   <222> (1292)..(1294)
   <223> Stopkodon des delta pckA-Allels

<400> 4
25 atgcgcggtta acaatgggttt gaccccgcaa gaactcgagg cttatgggtat cagtgcgcta 60
   catgatatcg tttacaaccc aagctacgac ctgctgtatc aggaagagct cgatccgagc 120
   ctgacagggtt atgagcgcggt ggtgttaact aatctgggtg ccgttgccgt cgataccggg 180
   atcttcaccg gtcgttcacc aaaagataag tatatcgccc gtgacgatac cactcgcgat 240
   actttctggt gggcagacaa aggcaaaggt aagaacgaca acaaacctct ctctccggaa 300
30 acctggcagc atctgaaagg cctgggtgacc aggcagcttt ccggcaaacg tctgttcggt 360
   gtcgacgctt tctgtggtgc gaacccggat actcgtcttt ccgtccgttt catcaccgaa 420
   gtggcctggc aggcgcattt tgtcaaaaac atgtttattc gcccgagcga tgaagaactg 480
   gcaggtttca aaccagactt tatcgttatg aacggcgcgga agtgcactaa cccgcagtg 540
   aaagaacagg gtctcaactc cgaaaacttc gtggcggtta acctgaccga gcgcatgcaa 600
35 gccgaattct gcagatcctg aagatggcac tatcgacttt gatgatggtt caaaaaccga 660
   gaacaccgcg gtttcttata cgatctatca catcgataac attgttaagc cggtttccaa 720
   agcggggcac gcgactaagg ttatcttcct gactgctgat gctttcggcg tgttgccgcc 780
   ggtttctcgc ctgactgccg atcaaaccga gtatcacttc ctctctggct tcacccgcaa 840
   actggccggt actgagcgtg gcatcaccga accgacgcca accttctccg cttgcttcgg 900
40 cgcggcattc ctgtcgctgc acccgactca gtacgcagaa gtgctggtga aacgtatgca 960
   ggcggcgggc gcgcaggctt atctggttaa cactggctgg aacggcactg gcaaacgtat 1020
   ctcgattaaa gatacccgcg ccattatcga cgccatcctc aacggttcgc tggataatgc 1080
   agaaaccttc actctgccga tgtttaacct ggogatccca accgaactgc cgggcgtaga 1140
   cacgaagatt ctcgatccgc gtaacaccta cgcttctccg gaacagtggc aggaaaaagc 1200
45 cgaaaccctg gcgaaactgt ttatcgacaa cttcgataaa tacaccgaca cccctgcggg 1260
   tgccgcgctg gtagcggctg gtccgaaact gtaa 1294

<210> 5
50 <211> 1248
   <212> DNA
   <213> Escherichia coli

<220>
55 <221> gene
   <222> (376)..(714)
   <223> ORF ytfP

<220>
60 <221> gene
   <222> Complement((461)..(727))
   <223> ORF yjfa

<400> 5
65 ggcgatgtcg caacaagctg ctttgtctta tttgctacgt ggacaagggc tggagagcga 60
   tcagagcgac agtgcggcaa tgacctcgat gctgattggt ttgggggttg cgaaagtgg 120

```

```

ccagattgtg ggtaaaatcg gcgagacggt tggcgtaagc aatttagcgc tcgacacca 180
gggagtaggc gactcctccc aggtagtggg cagcggtat gtattgccag gtctgcaagt 240
gaaatacggc gtgggtatat ttgactctat agcaacactc acgttacgtt atcgctgat 300
5 gcctaagcta tatctggaag ccgtgtctgg tgtagaccag gcactggatt tgctctatca 360
gttcgagttt tagcaatgcg aatatttgtc tacggcagtt tacgccacaa acaaggcaac 420
agtcactgga tgaccaatgc ccagttactg ggcgatttca gtatcgataa ctaccagttg 480
tatagcctgg gccactatcc aggcgcagtt ccgggggaacg gaacggtaca cggtgaagtt 540
tatcgtattg acaacgccac gctggccgaa cttgatgcct tgcgcaccag gggcggtgaa 600
tacgcgcgcc agttgattca gacgccgtac gggagtgcac ggatgtacgt ttatcaacga 660
10 cccgtcgatg gattaaagct aattgaaagc ggcgactggt tagacagga taagtaacca 720
tatgcatacg ccaccttcgg gtggcggtgt tttttgcgag acgactcgca ttctgtttt 780
taattccctc accttttgc tttctctccg agccgctttc catatctatt aacgcataaa 840
aaactctgct ggcattcaca aatgcgcagg ggtaaaaacgt ttcctgtagc accgtgagtt 900
atactttgta taacttaagg aggtgcagat gcgtattacc ataaaaagat gggggaacag 960
15 tgcaggtatg gtcattccca atatcgtaat gaaagaactt aacttacagc cggggcagag 1020
cgtggaggcg caagtgagca acaatcaact gattctgaca cccatctcca ggcgctactc 1080
gcttgatgaa ctgctggcac agtgtgacat gaacgccgcg gaacttagcg agcaggatgt 1140
ctggggtaaa tccaccctg cgggtgacga aatatggtaa agaaaagtga atttgaacgg 1200
20 ggagacattg tgctgggttg ctttgatcca gcaagcggcc atgaacag 1248

```

```

<210> 6
<211> 911
<212> DNA
25 <213> Escherichia coli

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(911)
30 <223> Deletion tragende ytfP-yjfa Region

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(383)
35 <223> 5'-Flanke der ytfP-yjfa Region

<220>
<221> misc_feature
<222> (384)..(911)
40 <223> 3'-Flanke der ytfP-yjfa Region

<220>
<221> misc_feature
<222> (376)..(378)
45 <223> ATG Kodon des trunkierten ORF ytfP

<220>
<221> misc_feature
<222> Complement((725)..(727))
50 <223> ATG Kodon des trunkierten ORF yjfa

```

```

<400> 6
ggcgatgtcg caacaagctg ccttgtctta tttgctacgt ggacaagggc tggagagcga 60
tcagagcgac agtgcgcaa tgacctcgat gctgattggg ttgggggttg cgaaaagtgg 120
55 ccagattgtg ggtaaaatcg gcgagacggt tggcgtaagc aatttagcgc tcgacacca 180
gggagtaggc gactcctccc aggtagtggg cagcggtat gtattgccag gtctgcaagt 240
gaaatacggc gtgggtatat ttgactctat agcaacactc acgttacgtt atcgctgat 300
gcctaagcta tatctggaag ccgtgtctgg tgtagaccag gcactggatt tgctctatca 360
gttcgagttt tagcaatgcg aattatgcat acgccacctt cgggtggcgt tgttttttgc 420
60 gagacgactc gcattctggt ttgtaattcc ctacaccttt gcttttctct ccgagccgct 480
ttccatatct attaacgcat aaaaaactct gctggcattc acaaatgcgc aggggtaaaa 540
cgtttcctgt agcacccgtg gttatacttt gtataactta aggaggtgca gatgcgtatt 600
accataaaaa gatgggggaa cagtgcaggg atggtcattc ccaatatcgt aatgaaagaa 660
cttaacttac agccggggca gagcgtggag gcgaagtga gcaacaatca actgattctg 720
65 acacccatct ccaggcgcta ctgcgttgat gcaactgctg cacagtgtga catgaacgcc 780
gcggaactta gcgagcagga tgtctggggg aaatccacc ctgcgggtga cgaaatatgg 840

```

taaagaaaag tgaatttgaa cggggagaca ttgtgctggt tggctttgat ccagcaagcg 900
gccatgaaca g 911

Patentansprüche

1. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß man folgende Schritte durchführt:
 - a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen man zumindest das
10 pckA-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen abschwächt, insbesondere ausschaltet,
 - b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien und
15
 - c) Isolieren der L-Aminosäure.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
25 daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
30 daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e), das (die) für das pckA-Gen kodiert (kodieren) abschwächt, insbesondere ausschaltet.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
35 daß man die regulatorischen und/oder katalytischen

Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein) verringert, für das das Polynukleotid pckA kodiert.

6. Verfahren gemäß Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
5 daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:
- 10 6.1 das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon,
6.2 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen,
15 6.3 das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen,
6.4 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende ppc-Gen,
6.5 die für die Transhydrogenase kodierende Gene pntA
20 und pntB,
6.6 das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB,
6.7 das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC
verstärkt insbesondere überexprimiert.
7. Verfahren gemäß Anspruch 1,
25 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:
- 30 7.1 das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen,

- 7.2 das für die Malat-Dehydrogenase kodierende mdh-Gen,
- 7.3 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfA,
- 7.4 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfP,
- 5 abschwächt, insbesondere ausschaltet oder die Expression verringert.
8. L-Aminosäuren produzierende Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen das pckA-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen abgeschwächt,
- 10 insbesondere ausgeschaltet sind, die eine Resistenz gegen α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure und gegebenenfalls eine kompensierbare partielle Bedürftigkeit für L-Isoleucin aufweisen.
9. Plasmid pMAK705 Δ pckA, das Teile der 5'-und der 3'-Region des pckA-Gens, entsprechend SEQ ID No. 3, enthält,
- 15 dargestellt in Figur 1.
10. Plasmid pMAK705 Δ yjfA, das die 5'- und die 3'-Flanke der ytfP-yjfA Region einschließlich sehr kurzer Reste der offenen Leserahmen yjfA- und des ytfP, entsprechend SEQ
- 20 ID No. 6 enthält, dargestellt in Figur 2.
11. Isoliertes Polynukleotid aus Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, enthaltend eine für die 5'- und 3'-Region des pckA-Gens kodierende Polynukleotidsequenz dargestellt in SEQ ID No. 4
- 25 insbesondere geeignet als Bestandteil von Plasmiden für die ortsspezifische Mutagenase des pckA-Gens
12. Isoliertes Polynukleotid aus Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, enthaltend die 5'- und 3'-Flanke der ytfP-yjfA Region, dargestellt in
- 30 SEQ ID No. 6, insbesondere geeignet als Bestandteil von Plasmiden für die ortsspezifische Mutagenese des offenen Leserahmens ytfP und/oder yjfA.

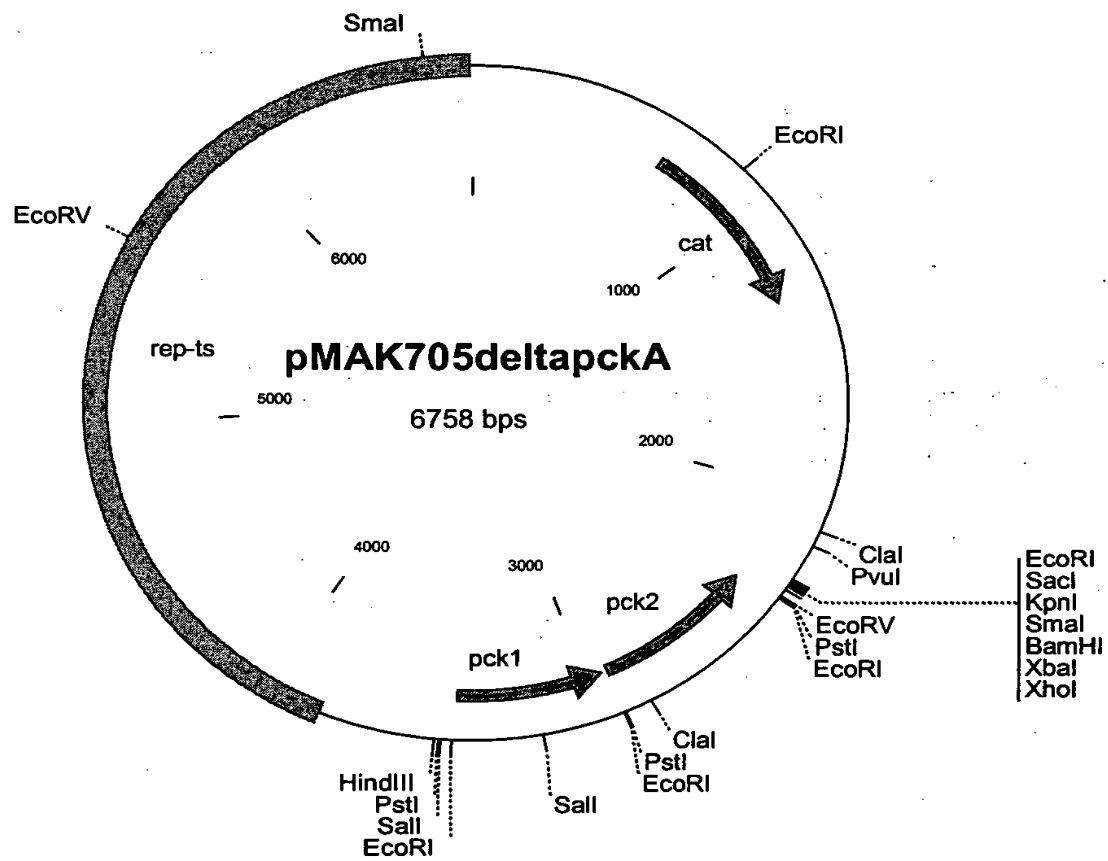
13. L-Threonin produzierende Stämme der Familie
Enterobacteriaceae, enthaltend eine Mutation im pckA-
Gen entsprechend SEQ ID No. 4.
14. L-Threonin produzierende Stämme der Familie
5 Enterobacteriaceae, enthaltend eine Mutation im offenen
Leserahmen ytfP, entsprechend SEQ ID No. 6.
15. L-Threonin produzierende Stämme der Familie
Enterobacteriaceae, enthaltend eine Mutation im offenen
Leserahmen yjfA, entsprechend SEQ ID No. 6.
- 10 16. L-Threonin produzierende Stämme der Familie
Enterobacteriaceae gemäß Anspruch 13, enthaltend eine
Mutation im offenen Leserahmen ytfP, entsprechend
SEQ ID No. 6.
- 15 17. L-Threonin produzierende Stämme der Familie
Enterobacteriaceae gemäß Anspruch 13, enthaltend eine
Mutation im offenen Leserahmen yjfA, entsprechend
SEQ ID No. 6.
18. L-Threonin produzierende Stämme der Familie
Enterobacteriaceae gemäß den Ansprüchen 13, 14 oder 15,
20 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß sie Resistenz gegen α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure
aufweisen, gegebenenfalls partielle und kompensierbare
Bedürftigkeit für L-Isoleucin besitzen.
19. Eschericia coli K-12 Stamm MG442 Δ pckA, hinterlegt unter
25 der Nummer DSM 13761 bei der Deutschen Sammlung für
Mikroorganismen und Zellkulturen.

**Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren
unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae**

Zusammenfassung

1. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-
5 Aminosäuren, insbesondere L-Threonin,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man folgende Schritte durchführt:
 - 10 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure
produzierenden Mikroorganismen der Familie
Enterobacteriaceae, in denen man zumindest das
pckA-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen
abschwächt, insbesondere ausschaltet,
 - 15 b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in
den Zellen der Bakterien und
 - c) Isolieren der L-Aminosäure.

Figur 1:



Figur 2:

